

⑫ 公開特許公報(A)

平4-179485

⑤Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬公開 平成4年(1992)6月26日

C 12 N 15/65
5/06
15/698717-4B C 12 N 15/00
7236-4B 5/00A
B

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全6頁)

⑭発明の名称 新規ベクターおよび該ベクターを用いて高発現形質転換細胞を選択する方法

⑯特 願 平2-305655

⑰出 願 平2(1990)11月9日

⑱発 明 者 宮 崎 純 一 熊本県熊本市東町4-2 東町南住宅3-101
 ⑲発 明 者 山 村 研 一 熊本県熊本市東町4-2 東町南住宅2-206
 ⑳出 願 人 宮 崎 純 一 熊本県熊本市東町4-2 東町南住宅3-101
 ㉑代 理 人 弁理士 長 井 省 三 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

新規ベクターおよび該ベクターを用いて高発現形質転換細胞を選択する方法

2. 特許請求の範囲

- (1) 活性の弱いプロモーターの下流に、変異を持つネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子を結合したものを選択マーカーとして持つ外来遺伝子発現用ベクター
- (2) 活性の弱いプロモーターが単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターである請求項(1)記載の外来遺伝子発現用ベクター。
- (3) 動物細胞で働く自己複製配列を有する請求項(1)記載の外来遺伝子発現用ベクター。
- (4) 自己複製配列が、パピローマウイルス由来の遺伝子配列である請求項(3)記載の外来遺伝子発現用ベクター。
- (5) 請求項(1)、(2)、(3)または(4)項のいずれかに記載の発現ベクターに外来遺伝子を組み込み、

これにより形質転換された細胞を、400 μg/ml以上の濃度のG418を含む培養液中で選択することにより、外来遺伝子を高発現する形質転換細胞を選択する方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、新規な発現ベクターおよび該ベクターを用いて、任意の外来遺伝子を高発現する形質転換細胞を効率良く選択する方法に関する。(従来の技術および発明が解決しようとする課題)

遺伝子組み換え技術の進歩に伴って、遺伝子組み換えを利用した有用物質の生産は近年急速に進歩して来ている。遺伝子組み換え技術を利用して外来遺伝子を発現させる場合には、適当な宿主細胞と、これに応じた外来遺伝子発現用プロモーターを有する発現ベクターが用いられる。これまでは、大腸菌や酵母など、取り扱いが容易な微生物が発現宿主細胞として広く研究されてきたが、このような微生物では外来遺伝子の発現において一部に限界があることが確認

されており、近年では高等動物培養細胞などを発現宿主細胞とした発現系が盛んに研究されている。これまで、動物細胞を宿主として、外来遺伝子を高発現させる方法として強いプロモーターを持つ発現ベクターを用いること、および細胞に導入され維持される発現ベクター DNA のコピー数を出来るだけ増加させることが考慮されて来た。後者の例として、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子 (dhfr) を欠損したチャイニーズハムスター卵巣細胞に、選択マーカーとして dhfr 遺伝子を持つ発現ベクターを導入し、次第に高い濃度のメソトレキセートで選択することにより、発現ベクター DNA のコピー数の増加した、外来遺伝子を高発現する形質転換細胞を得る方法がある。しかしながら、この方法は dhfr 欠損細胞でしか効果的に使えない点と、選択とクローニングに長期間を要する点が問題である。別の方法として、ウシバビロウィルス由来の自己複製配列を導入した発現ベクターを用いる方法がある。この方法では、細

胞に導入されたベクターはエピソードとして維持されるが、実際は染色体に組み込まれることも多く、高発現の形質転換細胞株を頻回にクローニングする必要がある。

このように遺伝子組み換え技術を応用した有用物質の製造を実用化するためには、様々の細胞株において、外来遺伝子を高発現する形質転換細胞のみを効率良く選択する技術の開発が強く望まれている。

(発明を解決するための手段)

このような状況において、本発明者らは、従来より選択マーカーとして一般に用いられる G 418 耐性遺伝子 (ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ II 遺伝子) を用いて、高濃度の G 418 で選択することにより、高いコピー数で発現ベクターが組み込まれた形質転換細胞を効果的に選択する方法を考案し、それが実際に応用可能であることを確認し、本発明を完成させるに至った。この方法は、非常に弱い活性を示すように改造した G 418 耐性遺伝子を発現ベクターに組み込み、これで形質転換細胞を作る。さらに高濃度 G 418 で選択することにより、多コピーの発現ベクターを組み込んだ細胞のみを効果的に残すというものである。選択マーカーとして、pSV2-neo が知られている (J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341, 1982) が、これが非常に強い G 418 耐性を形質転換細胞に与えるので本目的に適さない。ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ II 遺伝子で、変異のために活性が

非常に低い酵素を作るものが報告されている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87; 3435-3439, 1990)。この変異を持つ遺伝子を組み込んだプラスミドとして pMCIneo が報告されている (Cell, 51, 503-512, 1987)。このプラスミドにおいてネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ II 遺伝子はポリオーマ由来のエンハンサーに結合した単純ヘルペスウィルスのチミジンキナーゼプロモーターの下流に組み込まれ、またその 3' 側には SV 40 ウィルス由来のポリ A シグナルが結合されている。本発明ではプロモーター活性が弱いことが必要なのでポリオーマ由来のエンハンサーを除き、チミジンキナーゼプロモーターにより駆動されるネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ II 遺伝子を様々な発現ベクターに組み込むための Neo カセットとして用いている (第 1 図)。なお、Neo カセットに用いるプロモーターは活性の弱いものであれば他のものでよい。例として、SV 40 ウィルス初期遺伝子プロモーターからエンハンサーを除いたも

のなどが挙げられる。また、ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ II 遺伝子についても活性が野生型の遺伝子より弱くなるような変異を持つものであれば他のものでもよい。

本発明の外來遺伝子発現用ベクターの基本的な構造としては、既に報告されている強力な発現ベクター、例えば pAGS-3 (Gene, 79, 269-277, 1989) に上述の Neo カセットを組み込んだものである。実施例 1 に示す pAGneo 3-IL 2 プラスミドはこれにさらに IL-2 cDNA を組み込んだものである (第 2 図)。

また、このような本発明の発現ベクターは、大腸菌でのクローニングを行い易くするために大腸菌プラスミド由来の遺伝子を有する。そのような大腸菌プラスミド由来の遺伝子としては、大腸菌体内で複製するための ori、並びにクローニングの際に選択マーカーとなりうる適当な遺伝子、例えばアンピシリンや、テトラサイクリン等に対する薬剤耐性遺伝子が挙げられる。また、このような遺伝子としてプラスミド pBR 322

由来の遺伝子がよく用いられるが、この場合には、pBR 322 複製開始点 (ori) の近くにある、宿主細胞での複製を阻害する毒性配列 (Nature, 293, 79-81, 1981) を除去することが望ましい。後述の実施例に用いた発現ベクターは、この配列を除去している。

さらに、上記の発現ベクターにウシバビローマウィルス由来の自己複製配列を組み込むことにより、高濃度 G 418 選択後に高発現形質転換細胞をさらに効率良く得ることを可能にする。

上記のような DNA 配列から構成される本発明の好ましい発現ベクターの一例として、pAB neo 3 が挙げられる。これは実施例に示す pAB neo 3-IL 2 プラスミド (第 3 図) から、IL-2 cDNA を除いたものに相当する。

このような発現ベクターを用いて、その持つ外來遺伝子発現用プロモーターの下流に外來遺伝子を導入したものを構築する。このような発現させたい外來遺伝子を組み込んだ発現ベクターを導入する宿主細胞は、外來遺伝子発現用

プロモーターがよく働くものであれば何でもよい。例として、マウス L 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、ヒト Hela 細胞などが挙げられる。

発現ベクター宿主細胞への導入は既知の方法、例えばリン酸カルシウム法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76, 1373-1376, 1979)、DEAE-Dextran 法 (DNA cloning vol. II, IRL press, Oxford, 143-190, 1985)、エレクトロポレーション法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 7161-7165, 1984)、リポフェクション法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84, 7413-7417, 1987) 等により行うことが出来る。その後、G 418 を 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (力価) 含む培地中で培養を続け、G 418 耐性形質転換細胞を得る。これらの細胞を高濃度の G 418 (800 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む培地中で、さらに約 1 カ月間培養を続ける。この過程で発現ベクターを多コピー安定に導入された形質転換細胞のみが残る。これは、発現ベクターに組み込まれた Neo カセットの活性が著しく弱いため、多コピーのベクター DNA を持つ形質転換細胞のみが、高濃

度 G 418 下で増殖しうるためと考えられた。実際、G 418 を 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ として培養を続けた場合に比べ、800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で培養を続けた場合、形質転換細胞当たりの発現ベクターのコピー数が 5 倍以上増加し、200-300 コピーに達することが、サザンブロット法により確認されている。また、この解析により、導入された発現ベクターは、同方向に多数が連なって染色体に組み込まれていることが確認された。導入された発現ベクターの大幅な DNA 構造の変化は起こっていない。バビローマウィルス由来の自己複製配列を持つベクターでは細胞に導入された発現ベクターはエピソードとして細胞の核内で維持されることが考えられるが、1 カ月以上の G 418 選択の後では多コピーが連なった形で最終的には染色体に組み込まれていることが、サザン法による解析で示された。

なお、ポリオーマエンハンサーを含み、活性の強い Neo カセットを持つ発現ベクターを用いて上述と同様の操作を行った場合には高濃度 G 418 下での培養による、多コピーの発現ベクターを組み込んだ形質転換細胞の選択は認められない。

(発明の効果)

本発明のNeoカセットを持つ新規な動物細胞用の外来遺伝子発現ベクター及びそれを用いた高発現形質転換細胞の効率的選択法により、工業的レベルの生産においても十分利用可能な形質転換細胞が長期間にわたる細胞のクローニングなしに任意の細胞株を用いて容易に得ることが可能となった。また、本発明を用いて得られた形質転換細胞は長期にわたり安定に外来遺伝子の高発現を維持する。このような発現系は本発明により初めて確立されたので、本発明が産業界にもたらす技術的利益は非常に大きなものであると評価される。

(実施例)

本発明により効率的に、多コピーの発現ベクターを組み込んだ形質転換細胞が得られるが、実際に得られた形質転換細胞で外来遺伝子が高い発現を示すことが、外来遺伝子として、ヒトIL-2cDNAをいて確認されている。これらを実施例として本発明を詳細に説明する。

実施例1：発現ベクターpABneo3-IL2の構築

プラスミドpMC1neo(Cell, 51, 503-512, 1987)を制限酵素EcoRI(NEB#101), BamHI(NEB#136)で消化しDNAポリメラーゼKlenowフラグメント(NEB#210)で末端を修復したのち、tkプロモーター、neo, SV40ポリAシグナルより成る約1kbのNeoカセットDNA断片をアガロースゲル電気泳動により分離した。この断片をGENECLEAN(BIO 101 Inc.)によりゲルから回収、精製した。このNeoカセットの構造を第1図に示す。

ニワトリ θ -アクトチンプロモーターを用いた強力な発現ベクターであるpAGS-3(Gene, 79, 269-277, 1989)を制限酵素NdeI(NEB#111)で消化し、仔牛小腸由来のアルカリフォスファターゼの作用により脱リン酸化し、さらにDNAポリメラーゼKlenowフラグメントにより末端を修復した。

これを前述のNeoカセットDNA断片とT4DNAリガーゼを用いて、連結環状化することにより、発現ベクターpAGneo3を作製した。大阪大学細胞

実施例中のプラスミド、DNA、種々の酵素、大腸菌、培養細胞などを扱う諸操作は以下にあげる雑誌、成書を参考とした。

- (1) 遺伝子操作実験法、高木康敬、編者(1980)、講談社
- (2) 遺伝子操作マニュアル、高木康敬、編者(1982)、講談社
- (3) MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL, T. MANIATIS ら編, (1982), COLD SPRING HARBOR LABORATORY.
- (4) METHODS IN ENZYMOLOGY, 65巻, L. GROSSMAN ら編, (1980), ACADEMIC PRESS

なお、実施中には次の略号を用いた。

neo: ネオマイシンフォスフォートランスフェラーゼII
遺伝子

tk: 単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ遺伝子
BPV: ウシバビロームウィルス

kb: 1000塩基対

CHO: チャイニーズハムスター卵巣細胞

工学センター・谷口維紹教授より供与されたpZipSVIL2プラスミドを制限酵素BamHI(NEB#136)で消化し、アガロースゲル電気泳動し、ゲルから約0.5kbのヒトIL-2cDNAを含むDNA断片を得た。このDNA断片はヒトIL-2cDNA(Nature, 302, 305-310, 1983)の第41塩基対から第542塩基対を含む。このDNA断片をDNAポリメラーゼKlenowフラグメントで処理し、これにBstXIアダプター(InvitrogenN408-18)をT4DNAリガーゼで結合させた。前述のpAGneo3プラスミドをBstXI(NEB#113)で消化し、仔牛小腸由来アルカリフォスファターゼで脱リン酸化した後、前述のヒトIL-2cDNA断片とT4DNAリガーゼにより連結環状化した。このようにして、ヒトIL-2発現プラスミドpAGneo3-IL2を作製した。この構造を第2図に示す。

実施例2：pABneo3-IL2の作製

pDBPV-1プラスミド(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 79, 7147-7151, 1982)を制限酵素HindIII

(NEB#104)で消化し、これをDNAポリメラーゼ Klenow フラグメントで処理し、T4DNAリガーゼを用いてBamHI リンカー(NEB#1021)を結合した。これをBamHIで消化し、アガロースゲル電気泳動法により、長さ5.4 kbのBPVのいわゆる69%断片を回収した。

実施例1で構築したpAGneo3-IL2をBamHIで消化し、仔牛小腸由来アルカリフォスファターゼで処理し、これと前述のBPV 69%断片とT4DNAリガーゼで連結環状化した。このようにして、pABneo3-IL2を構築した。この構造を第3図に示す。

実施例3：マウスL細胞におけるヒトIL-2の産生

ファルコン6 cm ディッシュに 1×10^5 のマウスL細胞を撒き、翌日リポフェクチン試薬(BRL)を用い添付のプロトコールに従い、5 μ gのIL-2発現プラスミドpAGneo3-IL2、pABneo3-IL2をトランスフェクトした。2日後より、力価200

いNeoカセットを用いて、同様の選択を行った場合には、高濃度G418選択の効果はほとんど認められなかった。

実施例4：チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞におけるヒトIL-2の産生

ファルコン6 cm ディッシュに 2×10^5 のCHO細胞を撒き、その後実施例3と同じようにトランスフェクションとG418による選択を行い、さらに、実施例3と同様に産生されるヒトIL-2の活性を測定した。pABneo-IL2で形質転換したCHO細胞はやはりL細胞の場合と同様、800 μ g/mlのG418選択により、200 μ g/mlの選択による場合に比し、約6倍のIL-2の産生が得られた。この高い産生は、さらに3カ月間800 μ g/mlのG418の存在下で培養した後も全く変わらなかった。pAGneo3-IL2で形質転換したCHO細胞の場合も、やはり800 μ g/mlで選択した形質転換細胞の方が200 μ g/mlで選択したものより高いIL-2の発現を示したが、その効果はpABneo3-IL2の場合より少な

く、 μ g/mlのG418を含む培地で18日間培養を続けた。その結果、pAGneo3-IL2、pABneo3-IL2をトランスフェクトしたディッシュでともに約200個のコロニーが認められた。これらのコロニーをトリプシンEDTA液でディッシュより剥がし、25 cm² フラスコ4本に分割し、各々のフラスコを200, 400, 600, 800 μ g/ml(力価)のG418を含む培地中で1カ月間継代培養を続けた。各濃度で維持されたL細胞をファルコン細胞培養用6穴プレートに 1×10^5 細胞/穴ずつ撒き、G418を含まない培地中で培養した。48時間後、培養上清を分取し、ヒトIL-2測定キットQuantikine(R&D Systems, #D2000)を用いてIL-2活性を測定した。その結果、第4図に示すようにpABneo3-IL2で形質転換したL細胞は600, 800 μ g/mlで選択することにより、400 μ g/mlで選択した場合に比し、各々6倍、8倍の高いIL-2の発現を示した。このような高濃度G418選択による効果は、BPV由来の配列を含まない場合にも明らかに認められるが、効果は少なかった。なお、エンハンサーを含む活性の強

かった。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、実施例1で構築したNeoカセットの構造を示す。変異のため185番目のアミノ酸残基が野生型のGluからAspに変わっている。

第2図は、実施例1で構築した発現ベクターpAGneo3-IL2の構造を示す。

第3図は、実施例2で構築した発現ベクターpABneo3-IL2の構造を示す。

第4図は、pAGneo3-IL2およびpABneo3-IL2をマウスL細胞にトランスフェクトし、200 μ g/mlのG418で18日間、形質転換細胞を選択後、さらに200, 400, 600, 800 μ g/mlのG418存在下で1カ月間選択を続けて得られた形質転換細胞 10^6 個当たり、48時間に培養液中に分泌されるヒトIL-2活性を測定した結果を示す。—●—, pABneo3-IL2; —■—, pAGneo3-IL2

第5図は、pAGneo3-IL2およびpABneo3-IL2をチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞にト

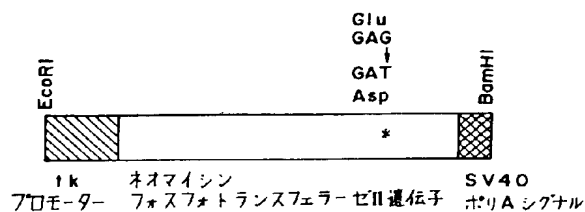
ランスフェクトし、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の G418 で 20 日間、
形質転換細胞を選択後、さらに 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の G418 存在下で 1 カ月間選択を続けて得られた形質転換細胞 10⁴ 個当たり、48 時間に培養液中に分泌されるヒト IL-2 活性を測定した結果を示す。—●—, pABneo3-IL2; —■—, pAGneo3-IL2

特許出願人 宮崎 純一

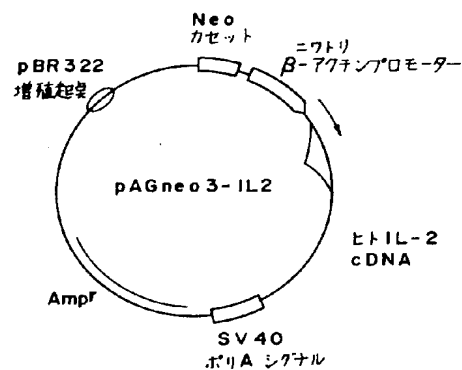
代理人 弁理士 長井 省三

“ “ 森田 拓

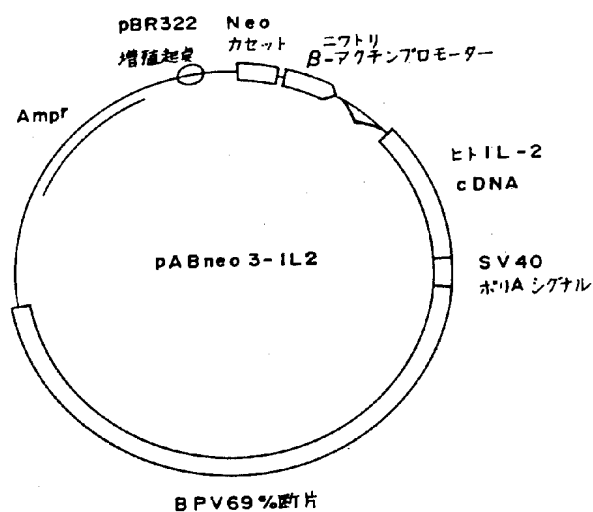
第 1 図



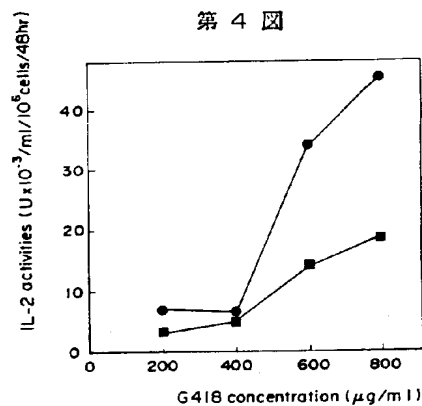
第 2 図



第 3 図



第 4 図



第 5 図

